⑤ 23-27

动 物 学 研 究 2000, Feb. 21 (1): 23～27 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

综 述

R169.41
Q492.5

国产避孕疫苗研究现状和前景

刘学高
（暨南大学生殖免疫研究中心 广州 510630）

摘要：国产第1代避孕疫苗已经研制成功。疫苗构建是采用妊娠特异性强、妊娠期短暂出现的糖蛋白激素——人类绒毛膜促性腺激素（human chorionic gonadotropic hormone，hCG）为靶抗原，应用蛋白质工程技术研制的。抗原不但保留了hCG的生物活性，而且不与垂体的其他3种激素交叉，并克服了"自身免疫耐受性"，使免疫系统对它作为"非自身"而产生抗体反应。以此构建的第1代避孕疫苗原型，经临床前非人灵长类的免疫原性、安全性和毒理学试验达到预期效果后，参照世界卫生组织人类生殖特别规划委员会避孕疫苗任务组指导委员会制订的第1期临床试验方案，两位主要研究工作者和10位输卵管结扎妇女志愿者接受了免疫注射，在严密的监护下完成了国产第1代避孕疫苗的第1期临床预初试验，结果证明疫苗在人体可诱发抗体反应，免疫反应有可逆性和记忆。受试者无任何毒副反应，月经周期正常，排卵不受影响。第2代新型避孕疫苗的研究，将在第1代原型的基础上，通过基因和蛋白质工程技术，解决抗原的大量生产、挖掘内在的决定簇，或引入外源性生殖活性抗原，构建多特异性多功能复合免疫原，发展复合避孕疫苗，这些都将是十分有吸引力的研究领域。

关键词：避孕疫苗；人类绒毛膜促性腺激素；非人灵长类安全试验；第1期临床预试验 生殖免疫学
中图分类号：Q492.5 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853(2000)01-023-05

1 研究现状

近30年来，随着生命科学的深入发展，科学家们发现免疫系统和生殖系统之间存在着密切而复杂的关系。以往所谓的不明原因不孕症中，有一部分属于免疫不孕。科学家们开始设想能否调动免疫系统来达到调控生殖的可能性，免疫避孕的构思由此而被提出。经过近30年的发展，各学科间的相互渗透，已形成一新的边缘学科——生殖免疫学，它是研究生殖过程中的免疫学现象，以及应用免疫学的理论和方法，实现对生殖活动的调控。避孕疫苗的研究已引起广泛的关注，各国际组织分别拨出巨额资金，组织协调国际性大协作，开展多中心合作研究，已研制出第1代、第2代避孕疫苗，并完成了第1、2期临床试验，取得了令人鼓舞的满意效果。使免疫避孕的构想成为现实，也使人类可以操纵自己的免疫系统来调控生殖活动的设想成为现实。(表1)(陈慰峰等，1999；Gupta，1988)。

总结起来，世界各研究中心采用的生殖关键抗原，hCG为首选。以hCG-β为主体，进行拼接或删减，以增加抗原决定簇和减少交叉反应性。

20多年的研究，免疫避孕领域取得了突破性进展，表现为：①人体的免疫系统是可以调控的，人为地操纵免疫反应，阻断某一特定的生殖环节是可能的。②生殖系统和生殖活动中，存在有特异的关键靶抗原，而机体的其他组织和其他生理活动中无类似的抗原存在。③免疫系统对自身的抗原所具有的免疫耐受性，可以通过蛋白质工程技术对抗原进行改造，使免疫系统不再能识别它为"自身"，而作为"非自身"发生免疫反应，产生特异性抗体。改造后的抗原仍保留自身的生物活性，产生的抗体具有中和原抗原生物活性的能力，产生避孕效果。④免疫反应消退后，抗体滴度下降，生育力恢复，说明免疫避孕是可逆的。⑤生殖特异抗原免疫、免疫系统发生记忆，如再次强化免疫，抗体反应再次出现。⑥无自身强化之虑。以hCG为例，接受免疫的妇女，如果将来妊娠，自身胎盘产生的hCG不会强化免疫反应。⑦抗体滴度下降后出现

收稿日期：1999-04-15；修改稿收到日期：1999-06-15

表1 以人类绒毛膜促性腺激素β亚单位（hCG-β）为基础的避孕疫苗

Table 1 Human chorionic gonadotropic hormone β subunit (hCG-β) based contraceptive vaccine formulation

研究单位(research institute)	疫苗构建设计方案(protocol of vaccine formulation)	现状和进展(current status & progress)
印度国立免疫研究所(Indian National Institute of Immunology)(Talwar等,1994)	羊垂体促黄体素α亚单位(OLH-α)与人类绒毛膜促性腺激素β亚单位(hCG-β)形成的异种二聚体(HSD, heterospecies dimer)偶联白喉类毒素(DT)或破伤风类毒素(TT)(OLH-α/hCG-β-DT或OLH-α/hCG-β-TT)	已开展二期临床试验,据报道,经148位有生育力妇女抗生育试验,1 224个月经周期,抗体滴度>50 ng/mL者仅1例失收,避孕有可逆性,抗体滴度下降至<35 ng/mL,生育力恢复,避孕效果可长达1年。
人口理事会(Population Council)(刘世苑,1993)	人类绒毛膜促性腺激素β亚单位偶联破伤风类毒素(TT)氢氧化铝吸附[hCG-β-TT-Al$(OH)_3$]	在完成非人灵长类安全性和毒理学试验的基础上,开展了第1期临床试验,免疫原性弱,安全性没问题。
世界卫生组织人类生殖特别规划委员会避孕疫苗任务组指导委员会(Steering Committee of Contraceptive Vaccine Research, HRP, W H O)(Jones等,1988)	人工合成人类绒毛膜促性腺激素β亚单位C末端(109-145)37肽段,偶联白喉类毒素,加免疫制激剂胞壁酰二肽,鲨烯和阿拉塞A乳化[hCG-β CTP(109-145)-DT+MDP-Squalene-Arlacel A]	在美俄亥俄州立大学完成狒狒的安全性和毒理学试验,以及免疫原性、抗生育试验后,在澳大利亚弗林德斯医学中心开展了第1期临床试验,证明疫苗可诱发抗体产生,但免疫原性弱,个体差异大,维持时间短,第2期临床试验尚未见报道。

妊娠、抗生育阈值以下抗体的存在不会对胎儿产生影响。印度2期临床试验少数阈值下抗体滴度发生怀孕，未出现畸胎等毒副作用。⑧避孕疫苗为生物制剂，所用抗原为人体所产生的生物活性物质，无一般药物的毒副作用，对后代无影响。印度2期临床试验少数怀孕妇女大多采取中止妊娠、一例维持正常妊娠、分娩，后代发育正常。

早在70年代后期我国派专家组进入世界卫生组织，有关专家分别加入到人类生殖特别规划委员会和其属下的各任务组指导委员会，包括：女性组、男性组、药物组、宫内节育器组、避孕疫苗任务组。笔者受国家委派加入避孕疫苗任务组指导委员会，与来自其他8个国家的9位专家一起，组织领导了避孕疫苗研究的世界性大协作攻关。在连续两任7年间经历了避孕疫苗的基础性抗原筛选，后确定以hCG-β为首选生殖特异靶抗原，构建以hCG-β-CTP（109～145）37肽段为抗原的第1代避孕疫苗。经狒狒的免疫原性、安全性及毒理学试验，抗生育试验，并一起规划设计了第1期临床试验方案。

“七·五”期间，我国比较研究了几类抗原（表2），得出以下几点认识：①hCG抗原应列为首选生殖特异抗原，因为它是妊娠所必需的关键抗原。②特异地存在于胎盘绒毛，其他组织无此激素，故无交叉反应之虑。③正常机体不存在，仅在妊娠期内暂时性出现的激素。④它的分子结构已十分清楚。⑤hCG-β中存在着决定簇如hCG-β-CTP（109～145）37肽段，或（110～145）36肽段，这些决定簇诱发的抗体能中和hCG生物活性。⑥抗原决定簇暴露在外，可诱发抗体反应，如被大分子掩盖，则不能诱发抗体反应，如hCG-β-CTP（109～145）37肽段偶联TT，抗原决定簇在外，而hCG-β-CTP（110～145）36肽段-β-半乳糖苷酶则抗原决定簇被掩盖，不能诱发抗体反应。⑦hCG-β二聚体出现两个亚单位的立体决定簇，抗原性增加。⑧hCG-β酶切片段暴露被掩盖的内部决定簇也可增强抗体反应。

“八·五”国家下达指令性任务，由原攻关课题组hCG分课题组成员，开展hCG避孕疫苗的研究。经过5年的努力，构建成功hCG-β避孕疫苗原型，并完成非人灵长类的免疫原性、安全性和毒理学试验，在10名志愿者中开展第1期临床预初试验（表3）。

国产第1代hCG-β避孕疫苗的诞生，标志着我国在免疫避孕研究领域缩短了与国外的差距。与国外同类研究相比，我们仅用了10年的时间，投入经费120万元人民币，而世界卫生组织则用了23年，耗资1 800万美元。

2 前 景

国产第2代新型避孕疫苗的研究路线，仍是在借鉴、引进、总结、创新的方针指导下，从几个方面着手进行深入研究：

①从hCG-β分子内部结构上将抗原决定簇暴露或合成这些决定簇，拼接在hCG-β主体上或载体蛋白上，构建空间立体决定簇。Talwar（1994）的异种二聚体是个成功的尝试。hCG-β二聚体属同种β亚单位的聚合，出现二、三、四聚体，抗原

表 2　几种生殖特异抗原的比较研究（多中心合作研究）

Table 2　Comparative study on several reproductive specific antigens (multi center collaboration study)

攻关课题组 (state key project)	研究单位 (research unit)	研究内容 (research subject)	结果评估 (result evaluation)
HCG 分课题	广州暨南大学生殖免疫研究中心	应用基因工程技术将人工合成的 hCG-β-CTP(110~145)36 肽段基因克隆到大肠杆菌，表达成功后大量培养，超声破菌，分离融合蛋白 β 半乳糖苷酶 hCG-β-CTP(110~145)36 肽段，以此为抗原构建疫苗	由于大分子 β-半乳糖苷酶掩盖抗原决定簇 hCG-β-CTP(110~145)36 肽段，故抗原性弱，解聚后有改善，但易重新聚合
HCG 分课题	北京医科大学生殖医学研究所 中科院动物研究所	1. hCG-β 二聚体 2. hCG-β 酶切片段 分别以此为抗原构建疫苗	二聚体及酶切片段抗原性有所增加，但成分不稳定，免疫反应差异大
	上海计划生育科研所（刘世范等，1992）	人工合成 hCG-β-CTP(109~145)37 肽段偶联破伤风类毒素(TT)，以此为抗原构建疫苗	组分稳定，安全性好，无交叉反应，但抗原分子小，免疫反应弱，结果与 WHO 一致
精子抗原分课题	国家计划生育科研所	1. 大鼠 LDH-C4 2. 人精子膜抗原	LDH-C4 在恒河猴免疫抗生育试验，结果不理想。从人精子膜上分离出一组有潜在希望的特异抗原
卵透明带抗原分课题	上海一医大妇产科 广东计生所 辽宁计生所 沈阳计生所	构建抗猪卵透明带抗原的单克隆抗体	获几株杂交瘤株

（刘学高等，1991）

表 3　国产第 1 代避孕疫苗的构建、非人灵长类免疫原性、安全性和毒理学试验及第 1 期临床预试验①

Table 3　China's first generation contraceptive vaccine, its formulation, non human primate antigenecity, safety & toxicology study and first phase clinical pilot trial

"八·五" 攻关课题组 (state key project)	暨南大学生殖免疫研究中心、北京医科大学 上海计划生育科研所、中科院北京动物所
疫苗原型 (proto-type vaccine)	HCG-β-TT 氢氧化铝吸附 500 mg/mL 1.2 mL/瓶
质量控制 (quality control)	上海生物制品研究所加工制备、无菌、无热原、安全试验合格。 广东药检所第 2 次检验合格。 广东微生物学专家第 3 次质控检验合格。
临床前非人灵长类安全性和毒理学试验 (non human primate pre-clinical trial)	广东顺德灵长类中心，动物为恒河猴，证明疫苗有免疫原性，可诱发机体产生抗 hCG 抗体，加免疫佐剂可增强免疫反应，抗体滴度随时间延长而消退，有免疫记忆，强化注射可诱发更强的抗体反应，疫苗是安全的，无任何毒副作用。
人体先导试验（课题组组长和主持临床试验的研究人员）两个年龄层次（40 岁和 60 岁以上）(human pilot trial)	先接受一般体检、血常规、肝功、肾功及血液生化指标检验，免疫注射后 1 周内记录血压、心跳、体温、呼吸，每日 4 次，每 6 h 1 次，免疫后除因疫苗含有 TT，体温有短暂低烧外，无任何不良反应。生理指标均正常。 结果证明：有免疫原性，可诱发机体产生抗 hCG 抗体，无不良毒副反应。 安全性在人体合格。
第 1 期临床预初试验（10 名志愿者为输卵管结扎妇女，年龄 30~39 岁）(first phase clinical pilot trial)	志愿者按第 1 期临床试验筛选标准合格后进入，按临床试验方案在严密监视下进行。结果发现国产第 1 代避孕疫苗可引起抗体反应，第 2 次注射有回忆反应，抗体反应随时间推移会消退，有可逆性，无任何毒副反应，一般体检项目及月经周期无变化。血液常规参数、肝功、肾功、心功、血液、胆固醇等血液生化指标无变化，B 超显示子宫附件正常。LH、FSH、P、E_2、$T_4$5 种激素无异常，免疫安全性好。

①刘学高、李伟雄、刘世范等．1996　hCG-β 避孕疫苗研究总结报告（内部资料，未发表）[Liu X G, Li W X, Liu S F *et al*, 1996. Final report of hCG-β contraceptive vaccine research (confidential, unpublished)]。
朱伟杰，刘学高．1996．国产第 1 代 hCG 避孕疫苗第 1 期临床预实验（内部资料，未发表）[Zhu W J, Liu X G, 1996. First phase clinical pilot trial of china's first generation hCG contraceptive vaccine (confidential, unpublished).]（潘善培等，1998）。

性靠分子量的增大，成分难掌握。Talwar（1994）的异种二聚体是 $\alpha\cdot\beta$ 的共价键结合，二聚体成分稳定，而且 OLH－α 属异种蛋白，增强了其抗原性。Stevens（1996）也在 hCG－β 内部的空间立体决定簇上进行过尝试，并取得一定进展。

②从外部引进一些有特异性的生殖关键抗原，构建人工合成的、多特异性、多功能的复合抗原。诱发免疫系统产生多种抗体，从多个生殖关键部位阻断生殖过程，起到双保险或三保险的抗生育作用。构建复合疫苗，近 10 多年来国际上在卵表面透明带中已分离出含有精子受体蛋白的组分，Sacco 在这方面和 Yurewicz 合作，已取得突破性进展。分离得到含精子受体蛋白的 ZP－3 和其去糖基组分 ZP－3α 及 ZP－3β。用 ZP－3 免疫猴抗生育效果明显，但对卵巢功能有一定影响；去糖基后 ZP－3α、β 免疫兔，已发现对卵巢无影响；我们现在计划在食蟹猴用 ZP－3α、β 免疫观察其抗生育效果和对卵巢功能的影响。Talwar（1994）已用 ZP－3 将之引入 hCG－β，在恒河猴上进行了试验，结果甚为满意，完全消除了对卵巢的影响（Bagavant 等，1994）。所以，引入 ZP－α、β 既可代替 TT 作为异种载体蛋白，同时又有生殖活性，诱发的抗体能阻断精卵结合，在精卵结合早期起抗生育效应。比起 hCG 的抗早孕更为优越，二者结合在一起，形成双功能复合避孕疫苗，这将是一个十分有吸引力的研究领域（Uzumcu 等，1998）。

③在基因疫苗研究方面，科学工作者已提出基因免疫避孕的建议。国内已着手就两个有希望的抗原 hCG－β 和 ZP－α、β 中的肽段开展工作，探讨其可行性。

参 考 文 献

刘世范，王　毅，杜晓岩等，1992. SPDP 偶联 hCG β－CTP37 肽片段和破伤风类毒素的研究[J]. 生殖与避孕，**12**(3)：76～78. [Liu S F, Wang Y, Du X Y *et al*, 1992. Studies on the conjugate of hCG β-CTP and TT by SPDP coupling method. *Reproduction and Contraception*, **12**(3)：76－78.]

刘世范，1993. 人类绒毛膜促性腺激素避孕疫苗的研究现状和发展趋向[J]. 生殖与避孕，**13**(2)：155～157. [Liu S F, 1993. Current status and prospect of hCG contraceptive vaccine research. *Reproduction and Contraception*, **13**(2)：155－157.]

刘学高，李伟雄，刘世范等，1991. 国家"七·五"计划生育科技攻关课题"避孕疫苗"总结报告[A]. 见："七·五"期间计划生育科技成果论文摘要汇编[C]. 济南：山东科学技术出版社. 138～146. [Liu X G, Li W X, Liu S F *et al*, 1991. Final report of contraceptive vaccine research—national key project on family planning science & technology. In：Collected papers of national key project on family planing science & technology during the year of 1986－1990. Jinan：Shandong Science & Technology Press. 138－146.]

陈慰峰，何　维，王若翔等，1999. 从第十届国际免疫学大会看免疫学进展[J]. 上海免疫学杂志，**19**：1～7. [Chen W F, He W, Wang R X *et al*, 1999. Progress of immunology-impression of 10th international congress of immunology. *J. Shanghai Immunology*, **19**：1－17.]

潘善培，陈淑群，曹佐武等，1998. 国产第一代 β－hCG 避孕疫苗免疫恒河猴的抗体反应及免疫安全性研究[J]. 暨南大学学报(自然科学版)，**19**(3)：81～88. [Pan S P, Chen S Q, Cao Z W *et al*, 1998. Antibody response and safety studies on rhesus monkey immunized with the first generation of Chinese-made human chorionic gonadotropin (hCG) contraceptive vaccine. *J. Jinan University (Natural Science Ed)*, **19**(3)：81－88.]

Bagavant H, Thillai-Koothan P, Sharma M G *et al*, 1994. Antifertility effects of procine zona pellucida-3 immunization using permissible adjuvants in female bonnet monkeys (*Macaca radiala*)：Reversibility effect on follicular development and hormonal profiles[J]. *J. Reprod. Fertility*, **102**：17－25.

Gupta S K, 1998. The immunology of reproduction update[J]. *Immunology Today*, **19**：433－434.

Jones W R, Judd S J, Ing R M Y *et al*, 1988. Phase Ⅰ clinical trial of world health organization birth control vaccine[J]. *Lancel*, **1**：1295－1298.

Stevens V C, 1996. Progress in the development of human chorionic gonadotropin antifertility vaccines[J]. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **35**：148－155.

Talwar G P, Singh O M, Pal R *et al*, 1994. A vaccine that prevents pregnancy in women[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**：8532－8536.

Uzumcu M, Coskun S, Jaroudi K *et al*, 1998. Effect of human chorionic gonadotropin on cytokine production from human endometrial cells *in vitro* [J]. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **40**：83－88.

CURRENT STATUS AND PROSPECT OF CHINA'S CONTRACEPTIVE VACCINE RESEARCH

LIU Xue-gao

(*Center for Reproductive Immunology Research, Jinan University, Guangzhou* 510632)

Abstract: China's first generation of contraceptive vaccine has been developed through the multi-center collaboration research program supported by National Research Project during the past ten years. The basic principle of the vaccine's formulation was designed to use a key pregnant-depentent, transit present, tissue specific and molecular structure well-known glycoprotein hormone—human chorionic gonadotropic hormone through the application of protein engineering techniques, the crossreactivity with three other pituitary glycoprotein hormones and the immunotolerance of the body to this "self" hormone have been overcome and the biological activity of hCG remained intact. Pre-clinical non-human primate toxicology & safety study has been carried out in Guangdong Primate Center successfully. Two principal investigators of this research project have received the pilot inoculation of China's first generation of contraceptive vaccine to obtain the direct experience of immune response, ten volunteers of tubular ligated female have entered into the first phase clinical pilot trial in 1995 and successfully proved that China's first generation of hCG controceptive vaccine is immunogenic, safe, no toxic reactions in human beings.

The formulation of second generation of a new vaccine to enhance the immunogenecity through protein and genetic engineering is now in progress.

Key words: Contraceptive vaccine; hCG; Non-human primate trial; First phase clinical pilot trial